UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 52

CONTRIBUTION A L'ETUDE D'UN NOUVEL ANTITUBERCULEUX : L'ETHAMBUTOL

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
présentée et soutenue publiquement en Juin 1962
par

ROBERT DOUSSET
LICENCIÉ ÈS SCIENCES

MEMBRES DU JURY :

M. GADRAT	Président
M. MOREL Mme ENJALBERT M. DELAUDE	Assesseurs
M. RIBAUT	Suppléant

Imprimerie Reise - 2, rue de la Jeunesse - TOULOUSE

CONTRIBUTION A L'ETUDE D'UN NOUVEL ANTITUBERCULEUX : L'ETHAMBUTOL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0015

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 52

CONTRIBUTION A L'ETUDE D'UN NOUVEL ANTITUBERCULEUX : L'ETHAMBUTOL

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
présentée et soutenue publiquement en Juin 1962

par

ROBERT DOUSSET
LICENCIÉ ÈS SCIENCES

MEMBRES DU JURY :

M. GADRAT	Président
M. MOREL M^me^ ENJALBERT M. DELAUDE	Assesseurs
M. RIBAUT	Suppléant

Imprimerie Reise - 2, rue de la Jeunesse - TOULOUSE

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN	MM.	LAZORTHES.
1er Assesseur		BLANC.
2e Assesseur		N.
Doyens honoraires		GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	VALLOIS.	MM. RIBAUT.
	CLERMONT.	NANTA.
	DUCUING.	DELAS.
	TAPIE.	RISER.
		SOULA.

SECTION MÉDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM.	MÉRIEL. GADRAT.
Clinique chirurgicale et Gynécologie		FABRE (P.).
Clinique chirurgicale et du Cancer		GRIMOUD.
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie		VIRENQUE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		BAZEX.
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne		MOREL.
Clinique des maladies des Voies urinaires		LHEZ.
Clinique médicale infantile et Puériculture		SOREL.
Clinique de Neurologie et Psychiatrie		GERAUD.
Clinique obstétricale		GUILHEM.
Clinique Odonto-Stomatologie		N...
Clinique Ophtalmologique		CALMETTES.
Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale		CALVET.
Clinique Rhumatologique		RUFFIE (R.).
Clinique traumatologique des membres		RIEUNAU.
Accouchement et Obstétricie sociale		PONTONNIER.
Anatomie		LAZORTHES.
Anatomie appliquée		POULHÈS.
Anatomie pathologique		FABRE (J.).
Bactériologie, Hygiène, Médecine sociale		ANDRIEU.
Chimie biologique		VALDIGUIÉ (P.).
Electroradiologie		MARQUES.
Embryologie générale		BROUSSY (Jean).
Histologie		BIMES.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie		DARNAUD.
Médecine légale et du Travail		PLANQUES.
Médecine Sociale		BOUNHOURE.
Parasitologie		BOUISSET.
Pathologie chirurgicale		DAMBRIN.
Pathologie générale et médecine expérimentale		SENDRAIL.
Physico-Chimie		AUVERGNAT.
Physiologie		LAPORTE (Y.).
Physiologie appliquée et Parmacologie		BAISSET.
Physique biologique et médicale		BUGNARD.
Propédeutique médicale		N...
Thérapeutique		DARDENNE.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée	MM.	COULOUMA.
Pathologie médicale		LAPORTE (J.).
Bactériologie	Mme	ENJALBERT.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale	MM.	DOUSTE-BLAZY.
Physique médicale		BRU.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Anatomie	MM.	BASTIDE.
Anatomie pathologique		DOUISSOU.
Anesthésiologie		LARENG.
Carcinologie		ESTRADE.
Histologie et embryologie		PLANEL.
Parasitologie		RUFFIÉ (J.).
Pathologie expérimentale		GLEIZES.
Physiologie		MONTASTRUC
Physiologie		BESSOU.
Physique Médicale		COMMANAY.

AGRÉGÉS

Médecine générale	MM.	MONNIER. RIBAUT. DELAUDE. CALAZEL. RASCOL.
Chirurgie générale		ANJALBERT. FICAT. PASQUIÉ. SOUQUET. SARRAZIN.
Dermatologie Syphiligraphie		DUPRÉ.
Hydrologie		DENARD.
Médecine légale		GREZE-RUEFF.
Obstétrique		ESPAGNO.
Odontostomatologie		CADENAT (H.).
Pédiâtrie		BARDIER (A.).

AGREGES LIBRES

Anatomie	MM.	THOMAS.
Ophtalmologie		DEODATI.
O.R.L.		CLAUX.
Pathologie Chirurgicale		DIEULAFÉ.

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et Cryptogamie	Mme	DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, toxicologie et Hygiène Industrielle	MM.	BOURBON.
Chimie Pharmaceutique		BLANC.
Matière médicale		VINCENT.
Pharmacie chimique et Pharmacodynamie		CAUJOLLE.
Pharmacie galénique		STANISLAS.
Zoologie		ROUX.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie	M.	COUTURIER.

PROFESSEUR SANS CHAIRE

Sciences naturelles	Mme	CAUJOLLE.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Microbiologie	MM.	BREUILLAUD
Sciences physiques		PITET.
Toxicologie		BROUSSY (G.).

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal	M.	ROCHE.
Secrétaire		BERRUT.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

AUX MIENS

ET A MES AMIS

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GADRAT

Professeur de clinique médicale
Médecin des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

qui a bien voulu nous faire le grand honneur de présider notre jury de thèse. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL

Professeur des maladies de la tuberculose et pathologie interne
Chevalier de la Légion d'Honneur

MADAME LE PROFESSEUR ENJALBERT

Professeur à la Faculté

MONSIEUR LE PROFESSEUR DELAUDE

Professeur agrégé de Médecine générale
Médecin des Hôpitaux

qui a bien voulu nous confier ce travail et nous conseiller dans sa rédaction

MONSIEUR LE PROFESSEUR RIBAUT

Professeur agrégé de Médecine générale

Nous exprimons notre gratitude et notre déférence.

A MONSIEUR LE DOCTEUR G. MOREAU

Assistant des Hôpitaux

à l'amabilité de qui nous devons les microphotographies figurant dans notre thèse. Nous lui adressons nos remerciements les plus vifs.

PLAN

I. — INTRODUCTION.

II — L'ETHAMBUTOL. - GENERALITES.

III. — TRAVAUX SUR LE RACEMIQUE.

— *in vitro.*

— chez la souris.

— chez le cobaye.

IV. — TRAVAUX SUR L'ETHAMBUTOL.

— *in vitro.*

— chez la souris.

V. — NOTRE EXPÉRIENCE DE L'ETHAMBUTOL.

— *in vitro.*

— chez le cobaye.

VI. — CONCLUSION.

I. - INTRODUCTION

Si depuis 20 ou 30 ans la mortalité due à la tuberculose a considérablement baissé, par contre la morbidité est restée à peu près la même ; et ceci malgré les très grands progrès réalisés dans la thérapeutique de cette maladie et en particulier la découverte d'agents chimiothérapiques actifs sur le bacille de Koch.

Ce fait s'explique bien quand on sait que, alors qu'on obtient plus de 90 % de guérisons lorsque le premier traitement antibiotique a été bien fait, ce pourcentage tombe à 40 % lorsque ce traitement a été mal fait.

En effet, un traitement incorrect (utilisation d'un seul agent antibacillaire ou bien association correcte mais à dose insuffisante) a de fortes chances de faire apparaître une tuberculose résistante aux antibiotiques et dès lors de mauvais pronostic.

L'apparition de souches microbiennes antibio-résistantes observée en particulier pour les Staphylocoques (en 1944 à peu près 100 % des souches de Staphylocoques étaient sensibles à la pénicilline ; en 1950 seulement 50 % de ces souches avaient conservé la sensibilité à cet antibiotique) ne tarda pas à se manifester pour les deux premiers agents antituberculeux vraiment actifs : la Streptomycine et le P.A.S.

En 1946-47, sur 551 souches de bacilles tuberculeux étudiées on trouve 551 souches streptomycino-sensibles, alors qu'en 1951 sur 52 souches étudiées on trouve 12 souches, soit 23 %, résistantes à 20 gamma de Streptomycine par ml.

Il en est de même pour la sensibilité au P.A.S. En 1947-48, 73 souches étudiées étaient sensibles ; en 1951, 5 sur 50, soit 10 % sont P.A.S.-résistantes. Ces chiffres observés en 1951, c'est-à-dire après 3 ou 4 ans d'emploi abusif et souvent peu judicieux de ces deux médicaments, confirmaient déjà le phénomène de la sélection dans le temps des souches streptomycino-résistantes et P.A.S.-résistantes (J. Baudot, A. Delaude et M^lle^ Gay).

Par la suite, alors que l'Isoniazide s'était révélé comme une médication antibacillaire particulièrement puissante, *in vitro*, chez l'animal et chez l'homme, on vit se multiplier les souches isoniazido-

résistantes. (Cette isoniazido-résistance n'étant absolument pas, comme on avait pu le penser un moment, synonyme d'avirulence). Et ceci encore une fois, en raison de fautes thérapeutiques par insuffisance de traitement ou plus souvent encore par mauvaise association des médicaments antituberculeux.

Ce fait est d'autant plus grave que les malades devenus porteurs de germes résistants peuvent disséminer ceux-ci autour d'eux et être à l'origine de contaminations.

Il n'est donc pas étonnant que l'on ait noté une augmentation, au cours des années, du nombre des malades porteurs de souches isoniazido-résistantes avant tout traitement : Dissmann et Iglaner mentionnent ce phénomène dans 3 % des cas en 1955, dans 4 % en 1956, dans 7 % en 1957, et dans 9 % en 1958. Canetti et ses collaborateurs l'observent dans 9 % des cas en 1957.

Ainsi l'inobservation ou l'ignorance des règles de la thérapeutique antibacillaire est responsable du fait qu'il est fréquent de rencontrer des malades porteurs de bacilles résistants aux principaux agents antituberculeux :

— soit qu'il s'agisse de rechute chez un malade incorrectement traité ;

— soit qu'il s'agisse d'un malade jamais soumis à l'antibiothérapie et cependant porteur de bacilles résistants.

L'utilisation de médicaments tels que l'Ethionamide (qui est cependant un bon antituberculeux), la Viomycine, la Kanamycine ou la Cyclosérine, n'ayant pas résolu le grave problème de ces tuberculoses à bacilles résistants, il est évident que la découverte et l'étude de nouveaux produits antituberculeux efficaces soulève un grand intérêt.

II. - L'ETHAMBUTOL - GENERALITES

Parmi les composés synthétiques étudiés de façon systématique sur une grande échelle, le N.N'-diisopropyléthylène-diamine se montra capable de protéger la souris d'une infection autrement mortelle, provoquée par la souche H 37 Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

Par la suite de nombreux composés voisins furent synthétisés sans amélioration appréciable de l'activité jusqu'à ce que des fonctions hydroxyles soient introduites.

Le produit le plus prometteur de cette série fut l'isomère dextrogyre du dichlorhydrate de 2,2'-(éthylènediimino)-di-1-butanol ou Ethambutol (1).

En effet, on connaît 3 isomères du 2,2'-(éthylènediimino)-di-1-butanol :

— le lévo-isomère inactif ;
— le méso-isomère très faiblement actif ;
— le dextro-isomère ou Ethambutol.

L'Ethambutol est un composé cristallisable, incolore et inodore. Il est thermostable et très soluble dans l'eau.

Son poids moléculaire est de 277.

Son point de fusion est approximativement 198-199° C.

Sa synthèse est realisée par chauffage rapide du dichloroéthylène avec un excès de 2-amino-1-butanol dextrogyre. L'isomère dextrogyre du 2,2'-(éthylènediimino)-di-1-butanol est obtenu avec un rendement de 42 %. Nous n'entrerons pas ici dans le détail de cette préparation qui est décrite par R.G. Wilkinson dans *Journal of the American Chemical Society*, 1961, 83, p. 2212.

Mais les travaux ont porté tout d'abord sur la racémique constitué par un mélange équimoléculaire du dextro-isomère et du lévo-isomère : il a été étudié *in vitro* (J.P. Thomas) et *in vivo* :

(1) Ethambutol est le nom générique réservé à la forme dextrogyre du 2,2'-(éthylènediimino)-di-1-butanol par le département des Laboratoires Lederle de l'American Cyanamid Company, qui a bien voulu nous fournir le produit utilisé dans notre étude.

— chez la souris (J.P. Thomas) ;
— chez le cobaye (A.G. Karlson).

En outre il a été procédé à des études comparatives du racémique et des trois isomères avec la Streptomycine et l'Isoniazide.

C'est l'ensemble de ces études que nous rapportons dans ce travail et que nous comparons à notre propre expérience *in vitro* et *in vivo* chez le cobaye.

III. - TRAVAUX SUR LE RACEMIQUE

1) - In vitro (THOMAS).

Les études *in vitro* ont montré que des concentrations de 1 à 4 gamma de racémique par ml de milieu liquide Sauton inhibaient la croissance de la souche H 37 Rv et celle de ses variantes isoniazido et streptomycino-résistantes.

Des concentrations analogues inhibaient la croissance des souches Brownell et Coffey, ainsi que la croissance de *Mycobacterium smegmatis, M. ranei et M. phlei.*

La souche H 37 Rv a subi huit passages consécutifs en présence de concentrations croissantes du nouveau composé sans que l'on observe une augmentation significative de la concentration nécessaire pour obtenir une action inhibitrice.

Il a été démontré que ce composé est actif uniquement sur les organismes du genre *Mycobacterium* : il est inactif *in vitro* (et *in vivo*) sur d'autres bactéries, champignons et virus.

2) - Chez la souris (THOMAS)

• Le racémique a été étudié chez la souris femelle adulte inoculée par voie intraveineuse avec la souche H 37 Rv. Le composé a été comparé à l'Isoniazide pour l'administration par voie orale et avec la Streptomycine pour l'administration par voie parentérale.

Dans ces expériences 100 % des souris infectées et non traitées (contrôle) meurent entre le 14e et le 26e jour de l'infection, avec une survie moyenne de 17 jours.

Résultats :

Pourcentage de survivants au 60e jour de l'infection en fonction de la dose quotidienne de substance thérapeutique exprimée en mgr/kg/jour.

A) Voie orale (tubage)

Dose	*Racémique*	*Izoniazide*
6 400 mgr/kg/j.	90 %	
3 200	100 %	
1 600	95 %	
800	100 %	
400	100 %	
200	100 %	*Toxique*
100	70 %	90 %
50	0 %	80 %
25		100 %
12		80 %
6		100 %
3		85 %
1,5		80 %
0,8		15 %

B) Voie sous-cutanée

Dose	*Racémique*	*Streptomycine*
1 600 mgr/kg/j	*toxique*	
800	100 %	*toxique*
400	90 %	95 %
200	95 %	75 %
100	60 %	50 %
50	15 %	40 %
25	15 %	20 %
12	0 %	0 %

• Des traitements avec des doses croissantes de drogue, utilisant 20 souris par groupes de traitement, ont débuté le jour de l'inoculation et se sont poursuivis pendant 14 jours consécutifs.

L'activité a été évaluée d'après la dose nécessaire pour protéger 50 % des souris (DE 50) pendant 60 jours après l'inoculation alors que toutes les souris inoculées et non traitées mouraient dans les 26 jours suivant l'inoculation.

Résultats :

A) Voie orale (tubage)

	Racémique	*Isoniazide*
Dose max. tolérée en mgr/kg/j.	6 400	100
Dose efficace moyenne (DE 50) en mgr/kg/j.	90	1,2
Index d'efficacité (DMT/DE 50)	70	80

B) Voie sous-cutanée

	Racémique	*Streptomycine*
Dose max. tolérée en mgr/kg/j.	800	400
Dose efficace moyenne (DE 50) en mgr/kg/j.	90	80
Index d'efficacité (DMT/DE 50)	9	5

• Le composé a été administré par voie orale a des souris inoculées avec une souche bovine de *Mycobacterium tuberculosis* résistante à la dose maximum tolérée d'Isoniazide, et par voie sous-cutanée à des souris inoculées avec une variante de la souche H 37 Rv résistante à la Streptomycine. Ces infections étaient mortelles pour 100 % des souris témoins non traitées, dans un délai de 20 jours. Dans chaque expérience ce composé s'est montré aussi actif contre les souches résistantes que contre la souche H 37 Rv sensible à la fois à l'Isoniazide et à la Streptomycine.

Ce composé a été associé à des doses variées, à l'Isoniazide et au P.A.S., dans l'alimentation et a été associé à la Streptomycine pour l'administration par voie sous-cutanée à des souris infectées. Aucun antagonisme n'a été observé.

• La dose léthale unique moyenne (DL 50) du racémique sous forme de dichlorhydrate, chez la souris adulte non inoculée, s'est révélée supérieure :

— à 12 800 mgr par kg par voie orale ;
— à 1 600 mgr par kg par voie sous-cutanée.

et est comprise entre 800 et 1 600 mgr par voie intra-péritonéale, et entre 200 et 400 mgr par voie intra-veineuse.

• Une expérimentation basée sur l'inhibition de *Mycobacterium smegmatis* a été utilisée pour déterminer les concentrations en Ethambutol dans le sérum et l'urine provenant de souris, de rats, de chiens, ainsi que de sujets humains.

Chez la souris recevant une dose unique par voie orale, la

concentration maximum est atteinte une heure après l'ingestion. Le composé est rapidement excrété.

La concentration maximum, soit avec la dose maximum tolérée par voie orale, soit avec la dose maximum tolérée par voie sous-cutanée est d'environ 100 gamma par ml.

La dose efficace moyenne (DE 50) par tubage ou par injection sous-cutanée donne des concentrations maximum d'à peu près 3 gamma et 7 gamma par ml.

3) - Chez le cobaye (KARLSON).

Protocole expérimental :

36 cobayes mâles pesant chacun approximativement 500 gr sont inoculés par voie intra-péritonéale avec 0.1 mgr (poids humide) de la souche H 37 Rv.

Le 21e jour de l'infection, six animaux sont tués et on trouve chez eux des lésions tuberculeuses : augmentation de volume de la rate, lésions miliaires multiples dans le foie, masses fibro-caséeuses dans l'épiploon, ainsi que augmentation de volume et nécrose des ganglions lymphatiques, hépatiques et iliaques.

Le 21e jour de l'infection les 30 cobayes restants sont répartis en trois groupes de 10 animaux chacun et le traitement est mis en œuvre comme suit :

— groupe 1 (témoin) : les animaux reçoivent 1 ml d'une solution à 0.85 % de chlorure de sodium par voie sous-cutanée:

— groupe 2 : les animaux reçoivent par voie orale (tubage) 50 mgr du racémique en solution aqueuse (1 ml) :

— groupe 3 : les animaux reçoivent par voie sous-cutanée 50 mgr du racémique en solution aqueuse (1 ml).

Le traitement est donné en une dose unique quotidienne.

Après 62 jours de traitement, 6 des animaux du groupe 1 (témoin) étaient morts et 3 des 4 survivants de ce groupe étaient moribonds. L'expérimentation était alors interrompue et tous les animaux survivants étaient tués.

Survivants :

La moitié des animaux témoins étaient morts le 61e jour de l'infection alors qu'au même moment deux seulement étaient morts dans le groupe traité par voie orale et aucun dans le groupe traité par voie sous-cutanée.

A ce moment-là tous les animaux survivants du groupe témoin sauf un, semblaient malades et tous perdaient du poids ; deux des animaux traités par voie orale (et aucun dans le groupe traité par voie sous-cutanée) paraissaient malades.

Ainsi, il y avait peu de décès dans les groupes traités et aucun de ces animaux n'avaient de lésions tuberculeuses suffisantes pour expliquer le décès : un avait des lésions de pneumonie et deux avaient une hémorragie abdominale massive.

Observations nécropsiques :

Il n'y avait ni nécrose, ni fibrose, ni hémorragie dans le tissu sous-cutané aux points d'injections quotidiens de la drogue.

Chez les animaux témoins il y avait des lésions étendues dans les organes de prédilection (poumon, foie, rate) et en outre on notait la nécrose des ganglions lymphatiques et la présence de masses fibrocaséeuses dans l'épiploon.

Il est intéressant de remarquer que les animaux traités par voie orale avaient une atteinte pulmonaire relativement réduite, par comparaison avec les animaux témoins, mais qu'ils présentaient une atteinte massive des ganglions lymphatiques et de l'épiploon, et que six présentaient une atteinte diffuse du foie ou de la rate ou des deux ensemble.

A l'opposé, les lésions visibles chez les animaux qui recevaient la drogue par voie sous-cutanée étaient limitées à des lésions miliaires ou nodulaires du foie ou de la rate chez six animaux.

Cependant tous les cobayes de ce groupe avaient des foyers caséeux dans l'épiploon et les ganglions lymphatiques.

Examen microscopique :

L'examen histopathologique des tissus confirme les observations macroscopiques :

— Chez les animaux témoins il y avait des lésions progressives destructives dans les poumons, le foie et la rate ; ce qui est caractéristique de la tuberculose expérimentale du cobaye.

— Parmi les animaux traités par voie orale, six présentaient une transformation morbide identique du foie et de la rate : trois de ces animaux avaient reçu le traitement complet de 61 jours. Cependant deux seulement dans ce groupe avaient des lésions pulmonaires comparables en extension à celles exis-

tant chez les animaux témoins ; les autres avaient de petits amas de cellules épithélioïdes avec une nécrose minime.

— Chez les animaux traités par voie sous-cutanée il y avait moins de lésions tuberculeuses actives par comparaison avec les deux autres groupes.

Aucun animal n'avait autre chose que de petits foyers circonscrits de cellules épithélioïdes, sans nécrose dans les poumons. Il y avait des lésions dispersées mais circonscrites dans le foie et la rate de tous ces animaux, mais chez quatre d'entre eux seulement on trouvait des foyers nécrotiques, ceux-ci étant d'ailleurs bien limités.

Un index de tuberculisation basé sur l'extension et le caractère microscopique des lésions a été établi pour chaque groupe comme suit :

— groupe 1 (témoin)	73
— groupe 2 (trait. oral)	42
— groupe 3 (trait. sous-cut.)	15

Dans la méthode employée, la présence de lésions actives avec nécrose est cotée de 10 à 35 suivant l'extension, les lésions régressives sans nécrose sont cotées de 1 à 3 (schéma de Feldman).

Cultures bactériologiques :

Des cultures provenant de six des animaux traités par voie orale et de six des animaux traités par voie sous-cutanée ont été comparées en ce qui concerne la sensibilité à l'Ethambutol, sur gélose au jaune d'œuf, à la culture originale. Les cultures étaient inhibées par 0.5 ou 1 gamma par ml. comme pour les cultures témoins ce qui montre qu'il n'y a eu aucune augmentation de la résistance à la drogue.

On n'a pas essayé d'étudier la toxicité des traitements, mais certaines observations suggèrent qu'aux doses utilisées ce produit est relativement atoxique pour le cobaye.

Il n'a été mis en évidence aucune irritation locale comme par exemple nécrose, hémorragies ou fibrose dans le tissu sous-cutané au niveau des points d'injection.

Toxicité :

Les animaux qui répondaient favorablement au traitement demeuraient apparemment en bonne santé et ne perdaient pas de poids.

Les études histopathologiques n'ont révélé aucune altéra-

tion pouvant être attribuée à la toxicité de la drogue.

Quelques-uns des animaux du groupe traité présentaient quelques lésions rénales ressemblant à une néphrite interstitielle, mais ces altérations se retrouvaient chez les animaux témoins.

Cette étude montre que le composé racémique administré à dose de 50 mgr par jour a un net effet thérapeutique sur la tuberculose expérimentale du cobaye, en particulier lorsqu'il est administré par voie sous-cutanée. En effet l'index de tuberculisation est respectivement de 15 pour le groupe traité par voie sous-cutanée, de 42 pour le groupe traité par voie orale, et de 73 pour le groupe non traité.

Cependant il faut noter que ces résultats sont inférieurs à ceux que l'on pourrait attendre d'une dose unique quotidienne de 6 mgr de Streptomycine ou de 10 mgr d'Isoniazide.

En outre il semble que la toxicité de ce produit soit faible pour le cobaye.

IV. - TRAVAUX SUR L'ETHAMBUTOL

1) In vitro (A. G. KARLSON)

Protocole expérimental :

La gélose au jaune d'œuf contenant l'Ethambutol est préparée de la manière suivante : l'Ethambutol est pris dans le récipient d'origine avec une spatule stérile, pesé dans un tube stérile et dissous dans un milieu liquide Proskauer et Beck à la concentration de 10 mgr par ml. Cette solution n'est pas par la suite stérilisée, elle est refroidie et conservée par quantités de 3 ml. Pour l'utilisation, la solution est liquéfiée à la température du laboratoire et diluée dans un milieu liquide de Proskauer et Beck à des concentrations de 1000, 500 et 100 gamma par ml. 1 ml de chacune de ces dilutions est ajouté à 90 ml de gélose stérile fondue et refroidie. Le jaune d'un œuf frais est alors ajouté, ce qui donne un volume final de gélose au jaune d'œuf approximativement de 100 ml avec des concentrations en Ethambutol de 10, 5 et 1 gamma par ml respectivement.

La gélose est alors coulée obliquement dans des tubes stériles par quantités de 3 à 4 ml.

Pour ce qui est des bacilles acido-résistants, l'ensemencement est préparé en triturant des colonies provenant de cultures en bouillon stérile au fond d'un tube stérile au moyen d'une tige de verre.

Une densité finale égale approximativement à cinq fois celle du tube néphélomètre de Mc Farland n° 1 a été utilisée.

Chaque tube de milieu, y compris un tube témoin de gélose au jaune d'œuf, est ensemencé avec approximativement 0,1 ml de suspension.

Des observations préliminaires ont montré que la densité de la suspension bactérienne utilisée pour l'ensemencement n'était pas un facteur déterminant et que des résultats

comparables pouvaient être obtenus quand la densité était déterminée à l'examen visuel seul.

Les résultats des essais sur les bactéries acido-résistantes sont notés après 14 jours d'incubation à 37° C excepté pour *M. ulcerans* qui est incubé à 31° C pendant trois semaines.

Les essais portant sur des bactéries non acido-résistantes sont effectués en plaçant une goutte d'un bouillon de culture (de six heures) sur la surface de la gélose contenant les concentrations appropriées d'Ethambutol.

Les résultats de ces essais sont examinés après 24 heures d'incubation.

Résultats :

— Parmi les 170 souches de *M. tuberculosis* étudiées (y compris 4 souches isoniazido-résistantes, 4 souches P.A.S.-résistantes, 3 souches P.A.S. et isoniazido-résistantes et 2 souches P.A.S. et streptomycino-résistantes) la croissance de 115, soit 76 % était inhibée par 1 gamma d'Ethambutol par ml et la croissance des autres par 5 gamma par ml, c'est-à-dire la concentration immédiatement supérieure.

— Sur 23 souches de *M. bovis*, 18 étaient inhibées par 1 gamma et 5 par 5 gamma par ml.

— Sur 21 souches de *M. avium*, 10 étaient inhibées par 5 gamma, 3 par 10 gamma et 8 n'étaient pas inhibées par 10 gamma par ml.

— 3 souches de *M. ulcerans* et 14 souches de *M. fortuitum* n'étaient pas inhibées par 10 gamma par ml.

— Sur 10 souches de Mycobactéries chromogènes, deux étaient inhibées par 1 gamma et 8 par 5 gamma par ml.

— Sur 61 souches d'Achromobactéries, 12 étaient inhibées par 1 gamma, 24 par 5 gamma, 16 par 10 gamma et 9 n'étaient pas inhibées par 10 gamma par ml.

— Sur 35 souches de Scotochromobactéries, 5 étaient inhibées par 1 gamma, 21 par 5 gamma, 4 par 10 gamma et 5 n'étaient pas inhibées par 10 gamma par ml.

— 140 souches de Staphylocoques dorés, 30 souches d'Entérocoques, 67 souches de Coli aerogenes, 22 souches de Proteus et 28 souches de Pseudomonas n'étaient pas inhibées par 10 gamma par ml.

(D'autres études ont été effectuées sur ces mêmes souches et ont montré que 65 souches de Staphylocoques dorés, 34 d'Enterocoques, 52 de Coli aerogenes, 17 de Proteus et 25 de

Pseudomonas étaient résistantes à plus de 100 gamma d'Ethambutol par ml).

Ces résultats montrent que les bacilles tuberculeux pathogènes pour les mammifères, c'est-à-dire *M. tuberculosis* et *M. bovis* sont uniformément sensibles au produit dans une marge relativement étroite. En outre, parmi les 170 souches de *M. tuberculosis* étudiées la croissance de 115, soit 76 %, était inhibée par 1 gamma d'Ethambutol par ml et la croissance des autres par 5 gamma c'est-à-dire par la concentration immédiatement supérieure utilisée.

— On voit aussi que la sensibilité des Mycobactéries chromogènes est comparable à celle des bacilles tuberculeux. Par contre la sensibilité des Acromobactéries varie largement : 12, soit 20 %, des 61 souches étaient inhibées par 1 gamma par ml et 9, soit 15 %, étaient capables de pousser en présence de 10 gamma par ml.

On ne sait pas si les Achromobactéries ou les Scotochromobactéries dont la sensibilité est aussi variable, sont des groupes homogènes ; ces groupes peuvent être formés par différentes catégories de bactéries acido-résistantes.

— D'autre part, une large marge de sensibilité a été trouvée pour les 21 souches de *M. avium*, dont chacune a été identifiée par son effet pathogène sur l'animal.

— Le manque d'activité de l'Ethambutol sur les Cocci gram + et les bactéries gram — rappelle les propriétés de l'Isoniazide et de l'acide para-aminosalicylique, qui tous les deux ont une activité sélective sur les bactéries acido-résistantes, mais n'empêchent pas la croissance des bactéries non acido-résistantes.

2) - Chez la souris (WILKINSON).

Le produit a été étudié chez la souris, inoculé avec la souche humaine de *M. tuberculosis* H 37 Rv, et comparé aux deux autres isomères (lévo-isomère et méso-isomère), au racémique ainsi qu'à la Streptomycine et à l'Isoniazide.

Le traitement a été administré en une seule dose quotidienne :

— d'une part, par voie orale ;

— d'autre part, par voie sous-cutanée.

On a évalué en mgr/kg/jour la dose efficace moyenne (DE 50) qui, administrée pendant 14 jours à partir du jour de l'inoculation, donne une survie de 60 jours alors que les souris inoculées et non traitées meurent au bout d'un temps moyen de 17 jours et la dose maximum tolérée qui est la quantité en mgr/kg/jour, administrée pendant 14 jours qui donne une perte de poids d'à peu près 10 %

après une semaine. Ceci permet de calculer l'index d'efficacité (dose max. tolérée/dose efficace moyenne).

Résultats :

1) Traitement par voie orale

	DE 50	*Dose max. tolérée*	*Index. d'eff.*
Lévo-isomère	inactif	6 400	
Méso-isomère	500	6 400	
Racémique	90	6 400	
Dextro-isomère	45	6 400	120
Inoziazide	1,2	100	80

2) Traitement par voie sous-cutanée

	DE 50	*Dose max. tolérée*	*Index. d'eff.*
Lévo-isomère	inactif	800	
Méso-isomère	500	800	
Racémique	90	800	
Dextro-isomère	45	800	18
Streptomycine	80	400	5

On constate donc que l'activité antituberculeuse de ces isomères varie considérablement avec la configuration des carbones asymétriques ; le lévo-isomère étant inactif à la dose maximum tolérée, le méso-isomère étant peu actif, l'activité du racémique étant due toute entière au dextro-isomère.

Par contre la toxicité aiguë chez la souris des trois isomères et du racémique est la même à l'erreur expérimentale près (la raison de la remarquable stéréospécificité de cet agent est à l'étude).

Ainsi, dans la tuberculose expérimentale de la souris l'Ethambutol serait plus actif et moins toxique que la Streptomycine quand il est administré par voie parentérale et il posséderait par voie orale un index d'efficacité (dose max. tolérée/dose efficace moyenne) au moins égal à celui de l'Isoniazide.

Par ailleurs, l'Ethambutol se serait montré efficace dans le traitement retardé d'une infection mycobactérienne de la souris. Son activité sur les infections à Mycobactéries résistantes aux drogues habituelles a été démontrée : contre une infection mortelle de la souris due à une souche humaine résistante à la dose maximum tolérée de Streptomycine, il est aussi actif par voie parentérale que contre les souches sensibles à cette drogue. La même chose est vraie pour le traitement par voie orale d'une infection mortelle due à une souche bovine, résistante à la dose maximum tolérée d'Isoniazide.

V. - NOTRE EXPERIENCE DE L'ETHAMBUTOL

IN VITRO.

Les expériences ont été réalisées sur le milieu de Hérolds, avec des ensemencements riches. La technique utilisée est voisine de celle de Karlson.

Le produit a été essayé sur la souche H 37 Rv de *Mycobacterium tuberculosis* :

— 2 fois l'inhibition a été réalisée avec 6,4 gamma/ml ;

— 1 fois elle l'a été avec 3,2 gamma/ml.

D'autre part des essais ont été effectués en utilisant 39 souches de bacilles tuberculeux récemment isolés de malades :

— 22 étaient inhibées par moins de 1,6 gamma/ml
— 11 » » » 2,4 gamma/ml
— 4 » » » 3,2 gamma/ml
— 2 » » » 6,4 gamma/ml

Parmi ces souches 20 étaient résistantes à un ou plusieurs des antibiotiques suivants : Streptomycine, Viomycine, Cyclosérine, Ethionamide, P.A.S., Isoniazide.

L'association Ethambutol-P.A.S. a été aussi étudiée *in vitro*. Les premiers résultats font penser à la possibilité d'un effet antibactérien non seulement additionné mais peut être synergique.

IN VIVO.

Le produit a été utilisé dans l'infection tuberculeuse expérimentale du cobaye.

Le protocole expérimental, qui est à peu près analogue à celui du Docteur Karlson, est le suivant :

Le même jour, 65 cobayes d'un poids de 500 gr environ, reçoivent par voie sous-cutanée 0,05 mgr de la souche H 37 Rv. Au 22e jour de l'infection, 10 animaux choisis au hasard sont sacrifiés

de manière à vérifier l'homogénéité de l'inoculation et à connaître l'extension des lésions tuberculeuses au moment ou le traitement va être commencé. Ces 10 animaux constituent le groupe pré-traitement témoin.

Dès lors, les 55 animaux restant sont divisés de la manière suivante :

1° 10 animaux servent de témoins et ne reçoivent aucun traitement.

2° 10 animaux reçoivent 12,5 mgr d'Ethambutol par voie sous-cutanée toutes les 24 heures.

3° 10 animaux reçoivent 25 mgr d'Ethambutol par voie sous-cutanée toutes les 24 heures.

4° 10 animaux reçoivent 50 mgr d'Ethambutol par voie sous-cutanée toutes les 24 heures.

5° 15 animaux reçoivent 8 mgr de Streptomycine par voie sous-cutanée toutes les 24 heures également.

Le traitement est poursuivi pendant 79 jours, c'est-à-dire jusqu'au 101e jour de l'infection.

Les animaux sont autopsiés le jour même de leur décès s'il y a lieu et au 101e jour de l'expérience les animaux survivants sont sacrifiés.

— Les constatations macroscopiques sont représentées dans le tableau : Inoculations (fig. 1).

Sur ce tableau figurent schématiquement pour chaque animal autopsié :

— le point d'inoculation et les ganglions axillaires ;

— le ganglion trachéo-bronchique ;

— les poumons ;

— le foie ;

— la rate.

Les lésions miliaires ou nodulaires sont représentées par des taches petites ou grosses suivant le cas. Le noircissement d'un organe indique une atteinte diffuse.

Le nombre indiqué au-dessous de chaque animal schématiquement représenté, correspond au nombre de jours d'infection au bout duquel

— soit le décès s'est produit spontanément ;

— soit l'animal a été sacrifié (101 jours dans ce cas).

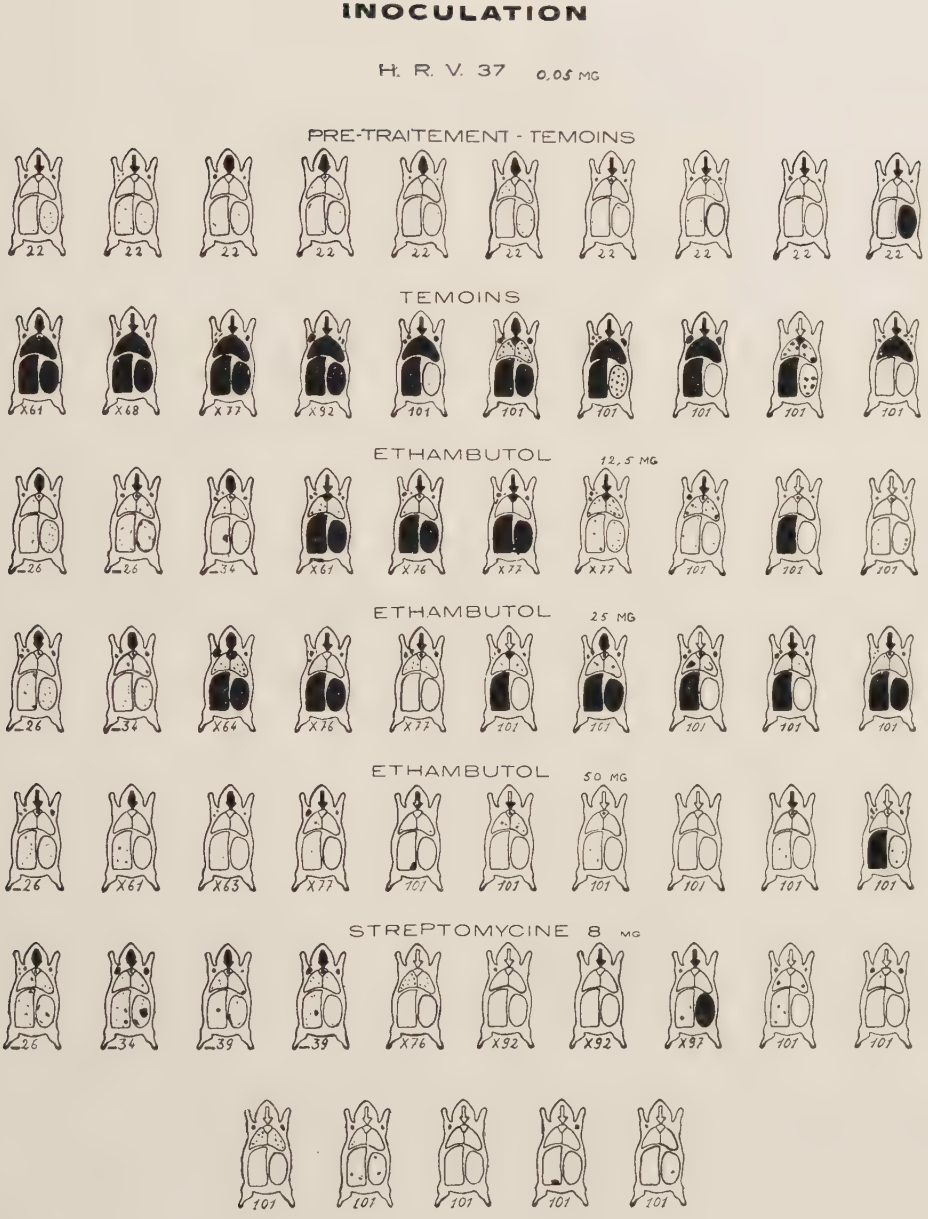

Fig. I. — Représentation schématique des constatations macroscopiques.

En outre, on a fait précéder du signe — les nombres se rapportant à des animaux morts avant 20 jours de traitement et dont il n'est pas tenu compte pour le calcul de la moyenne du groupe auquel ils appartiennent, et du signe X ceux qui se rapportent aux animaux morts spontanément avant le 101e jour de l'infection.

Les résultats sont exprimés numériquement en se basant sur l'index de cotation dont le détail est donné ci-dessous

a) siège d'inoculation et ganglions axillaires : (max. 1)

— tout négatif 0
— un ou plusieurs éléments positifs 1

b) poumons et ganglions trachéo-bronchiques : (max. 4)

— tout négatif 0
— le ganglion trachéo-bronchique seul positif 1
— pour chaque poumon présentant une lésion même minime 1
— un poumon présentant plus de 10 granulations est coté 2.
(4 reste cependant le maximum).

c) foie : (max. 4)

— négatif 0
— moins de 5 granulations 1
— entre 5 et 10 granulations 2
— plus de 10 granulations 3
— granulations incomptables ou lésions en nappes :
— très étendues 4
— occupant les trois quarts de l'organe 3
— occupant la moitié de l'organe 2
— occupant le quart de l'organe 1

d) rate : (max. 4)

— négative 0
— moins de 5 granulations 1
— entre 5 et 10 granulations 2
— plus de 10 granulations 3
— granulations incomptables ou rate hémorragique très augmentée de volume et porteuse de lésions en nappes :
— très étendues 4
— occupant les trois quarts de l'organe 3
— occupant la moitié de l'organe 2
— occupant le quart de l'organe 1

Total max. 13

L'utilisation de cet index de cotation nous a permis de traduire par un nombre l'extension des lésions tuberculeuses et de calculer pour chaque groupe une moyenne qui donne une idée de l'intensité de l'infection dans chacun des groupes considérés (tableau I).

TABLEAU I - COTATION DES LESIONS MACROSCOPIQUES.

Prétraitement TEMOINS.	
6- 6- 6- 7- 6- 8- 9- 8- 7- I0 :	Moyenne: 7,3
TEMOINS.	
I3- I3- I3- I3- II- I2- I2- II- 9- 7-:	Moyenne: II,4
ETHAMBUTOL I2,5 mg/jour.	
[9- I0- 8-*] I2- I2- I2- 8- 6- 7- 4-:	Moyenne: 8,7
ETHAMBUTOL 25 mg/jour.	
[8- I0-*] I2- I2- 7- 8- I2- 9- II- I3-:	Moyenne: I0,5
ETHAMBUTOL 50 mg/jour.	
[7-*] 2- 2- 4- 4- 4- 2- 0- 3- 5-:	Moyenne: 3,3
STREPTOMYCINE 8 mg/jour.	
[9- 9- 9- 8-*] 2- I- I- 6- 4- 2- 3- 4- I- 2- I-:	Moyenne: 2,4

* Les chiffres encadrés correspondent à des animaux morts avant 20 jours de traitement et exclus du calcul de la moyenne du groupe.

— Les résultats microscopiques comportent un examen du siège de l'inoculation et des ganglions axillaires, ainsi que s'il y a lieu, un examen du poumon et du ganglion trachéo-bronchique et un examen du foie et de la rate.

Les constatations histologiques faites au cours de ces différents examens sont cotées selon le schéma de FELDMAN, en fonction de l'extension des lésions d'une part et de leur caractère progressif (caséification ou follicules florides avec cellules géantes) ou régressif (tubercules fibreux ou calcification seulement) sur le plan histologique, d'autre part.

Les résultats sont rapportés dans le tableau II.

TABLEAU II - COTATION DES LESIONS HISTOLOGIQUES SELON LE SCHEMA DE FELDMAN

Prétraitement TEMOINS	
85- 65- 50- 65- 50- 85- 75- 75- 60- 65 :	Moyenne = 65,5
TEMOINS	
85- 100- 100- 85- 70- 85- 75- 75- 40- 50 :	Moyenne = 76,5
ETHAMBUTOL 12 mg/jour	
[65- 75- 75-]* 80- 80- 80- 70- 60- 31- 40 :	Moyenne = 51,5
ETHAMBUTOL 25 mg/jour	
[75- 75-]* 80- 90- 50- 27- 40- 50- 75- 50 :	Moyenne = 57,7
ETHAMBUTOL 50 mg/jour	
[75-]* 36- 23- 30- 31- 32- 30- 12- 30- 65 :	Moyenne = 31,5
STREPTOMYCINE 8 mg/jour	
[75- 85- 65- 60-]* 20- 1- 12- 40- 31- 10- 15- 22- 10- 31- 11 :	Moyenne = 18,4

*Les chiffres encadrés correspondent à des animaux morts avant 20 jours de traitement et exclus du calcul de la moyenne du groupe.

(Des exemples de ce système de cotation sont représentés sur les figures II et III et l'ensemble du système de cotation se retrouve dans le tableau III).

Signalons ici que les organes destinés à l'étude histologique sont traités suivant la technique histologique habituelle :

— fixation au Dubosq,

— inclusion dans la paraffine,

— coloration des coupes par l'Hématoxyline-éosine,

ou par l'Hématoxyline-érythrosine-safranine.

Il apparaît évident au terme de cette expérience que l'Ethambutol à la dose de 50 mgr/jour, administré par voie sous-cutanée, a non seulement enrayé la progression des lésions tuberculeuses chez les animaux traités, mais a provoqué une régression des lésions par rapport à ce qu'elles étaient au moment où le traitement a été entrepris.

Ces deux notions ressortent de l'étude des lésions macroscopiques d'une part, et de l'étude des lésions microscopiques d'autre part : en effet, en ce qui concerne les lésions microscopiques, notre groupe pré-traitement-témoin avait un index de tuberculisation de

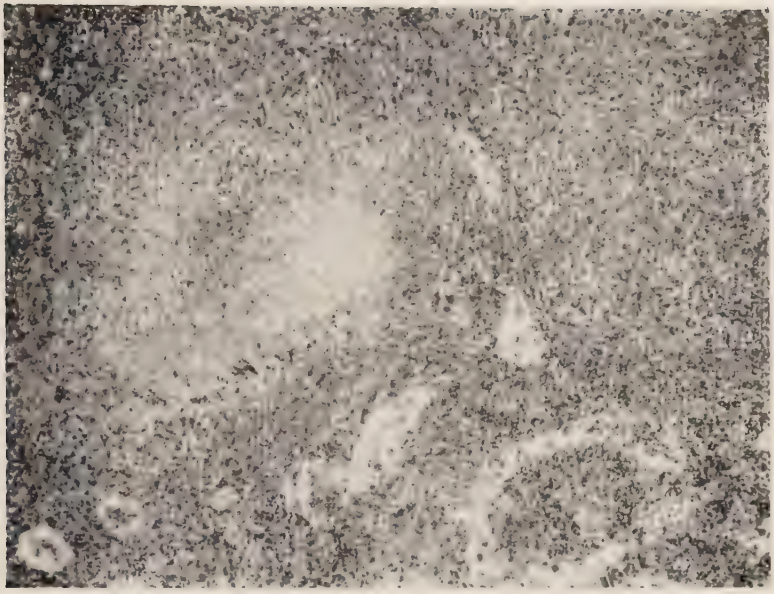

Fig. II. — Animal du groupe Témoin. Rate cotée 35, lésion progressive : plage caséeuse nodulaire entourée d'un granulome tuberculeux fertile.

Fig. III. — Animal du groupe traité par 50 mg d'Ethambutol. Rate cotée 3, lésion régressive : il subsiste un infiltrat épithélioïde au niveau d'un follicule splénique ; les sinus et les cordons sont normaux.

Tableau III

INDEX DE COTATION NUMÉRIQUE, D'APRÈS FELDMAN,
DES LÉSIONS HISTOLOGIQUES DE LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

Caractère et extension des lésions		Rate	Poumons	Foie	Siège d'inoculation et ganglions voisins	Ganglion trachéo-bronchique si le poumon est négatif ou porteur de lésions régressives seulement
Lésions progressives.	Très étendues.	35	30	25	10	10
	Moyennement étendues.	20	20	20	10	10
	Peu étendues.	10	10	10	10	10
Lésions régressives seulement.	Fibrose et «tubercules durs».	3	3	2	1	1
	Fibrose et calcifications seulement.	1	1	1	1	1
Valeur maxima totale : 100.		35	30	25	10	10 (si le poumon est négatif ou porteur de lésions régressives seulement).

65,5, alors que les animaux traités par 50 mgr d'Ethambutol n'ont à la fin de l'expérience qu'un chiffre moyen de 31,5.

Dans les conditions de notre expérience l'Ethambutol à la dose de 50 mgr/jour, s'est révélé légèrement moins actif que la Streptomycine à la dose de 8 mgr/jour ; c'est ce qui ressort surtout de l'étude histologique des lésions. Le tableau II montre en effet que l'index de tuberculisation pour les animaux qui ont reçu 8 mgr quotidiens de Streptomycine, n'est que de 18,4.

Il est important de signaler par ailleurs, que nous n'avons observé chez les animaux traités, aucun signe clinique de toxicité et que l'examen histologique des reins s'est révélé normal chez ces mêmes animaux.

Lorsqu'on compare nos résultats à ceux de KARLSON on est un peu surpris, puisque dans notre expérience portant sur la tuberculose expérimentale du cobaye, c'est 50 mgr par jour d'Ethambutol qu'il a fallu pour obtenir un net effet thérapeutique, alors que, si on se fie à l'expérience de KARLSON qui a utilisé le racémique à la dose de 50 mgr par jour, 25 mgr d'Ethambutol auraient dû suffire, puisque le racémique renferme 50 % de lévo-isomère inactif (WILKINSON).

Pour le moment, nous n'avons pas d'explication pour cette différence.

VI. - CONCLUSION

L'Ethambutol apparaît donc à l'heure actuelle, comme un produit tout à fait digne d'intérêt : c'est un antibacillaire puissant *in vitro* et *in vivo*, il est actif sur les bacilles résistants aux autres antibiotiques ; sa stabilité à la chaleur, sa parfaite solubilité dans l'eau, son poids moléculaire relativement peu élevé, sa toxicité réduite pour l'animal, constituent également de très gros avantages sur le plan pharmacologique ; il reste cependant bien évident que, seule son utilisation chez l'homme, permettra d'évaluer la valeur clinique de cette médication.

Vu : *Le Président* : GADRAT. Vu : *Le Doyen* : LAZORTHES.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 4 juin 1962

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :

DOTTIN.

VII. - BIBLIOGRAPHIE

Baudot (J.), Delaude (A.), Mlle Gay. — Adaptation des bacilles tuberculeux aux agents thérapeutiques. Acquisitions récentes. *Rev. de la tub.* 1952, 16, 1-2, 60-65.

Delaude (A.). — Les données récentes sur l'isoniazido-résistance. *Le Poumon et le Cœur*, 1961, n° 6.

Thomas (J.P.) et Coll. — A new synthetic compound with antituberculous activity in mice : ethambutol (Dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol). *Am. Rev. Resp. Dis.* 1961, 83, 891.

Wilkinson (R.G.) et Coll. — Stereospecificty in a new type of synthetic antituberculous agent. *J. Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 2212.

Karlson (A.G.). — Therapeutic effect of ethambutol (dextro-2,2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol) on experimental tuberculosis in guinea pigs. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1961, 84, 902.

Karlson (A.G.). — The in vitro activity of ethambutol (dextro-2.2'-(ethylenediimino)-di-1-butanol) against tubercule bacilli and other microorganismes. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1961, 84, 905.

Feldman (W.H.). — *Am. Rev. Tuberc.* 1943, 48, 248.